REF 43735	ZENIT RA GBM	Vertrieb durch
GEBRAUCHS-ANLEITUNG	IVD +2°C +8°C Σ 50	CE

VERWENDUNGSZWECK

Der Test *ZENIT RA GBM* ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) für die quantitative Bestimmung, mit dem speziellen Analysegerät *ZENIT RA*, von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG gegen die glomeruläre Basalmembran (Glomerular Basement Membrane oder GBM) in humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA, Natriumcitrat).
Dieser Test dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Beurteilung von Goodpasture-Syndrom und bei der Differentialdiagnose von Vaskulitiden.
ACHTUNG: Ärztliche Entscheidungen dürfen nicht ausschließlich auf dem Ergebnis dieses Tests beruhen, sondern sind auf der Grundlage der Beurteilung aller verfügbaren klinischen und Labordaten zu treffen.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM-AK) sind der serologische Marker einer seltenen Autoimmunkrankheit, die klinisch durch das Vorliegen einer rasch progressiven Glomerulonephritis und histologisch durch nekrotisierende extrakapilläre Glomerulonephritis mit linearer Immunfluoreszenz (Glomerulonephritis durch GBM-Antikörper) gekennzeichnet ist. Wenn gleichzeitig die Lungen betroffen sind (alveoläre Hämorrhagie), wird diese Erkrankung als Goodpasture-Syndrom (GPS) bezeichnet[1].
An der pathogenetischen Rolle der Antikörper besteht kein Zweifel; tatsächlich entstehen die Gewebeschäden durch die Bindung der GBM-Antikörper an die glomeruläre (und alveoläre) Basalmembran[2].
Das Zielantigen wurde in der nicht-kollagenen Domäne (NC1) auf der α3-Kette des Typ-IV-Kollagens, das ausschließlich in der Basalmembran der Nieren, Lungen, Cochlea und Augen zu finden ist, identifiziert[3].
Goodpasture-Syndrom ist eine sehr schwere Krankheit, die ohne rechtzeitige und angemessene Behandlung häufig fulminant verläuft[4]. Trotz der therapeutischen Fortschritte hängen das Überleben des Patienten und des Organs noch immer stark vom Schweregrad der Niereninsuffizienz zu Beginn der Untersuchungen ab, so dass eine frühzeitige Diagnose für das Überleben des Patienten und die Wiederherstellung der Nierenfunktion unabdingbar sind.
Die Diagnose der Erkrankung durch GBM-Antikörper oder des GPS beruht auf dem Nachweis linearer Ablagerungen von Immunglobulinen auf der glomerulären Basalmembran mittels einer direkten Immunfluoreszenzmethode an einer Nierenbiopsie. In vielen Fällen kann eine Nierenbiopsie jedoch gar nicht oder erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, so dass die serologische Diagnose eine fundamentale Rolle spielt. Zirkulierende GBM-AK können mittels indirekter Immunfluoreszenz auf

Primatennieren nachgewiesen werden; diese Methode hat eine hohe Spezifität, aber eine unzureichende Sensitivität[5]. Heute sind immunometrische, quantitative und antigen-spezifische Nachweismethoden verfügbar, die auf ELISA-, Fluoreszenzimmunoassay- und Cheminlumineszenz-Methoden beruhen und aufgelöste komplette GBM, die α3(IV)-Kette des Kollagens und seit Kurzem GP-Antigene in humaner rekombinanter Form verwenden[6]. Die diagnostische Sensitivität der antigen-spezifischen Tests ist sehr hoch, zwischen 94,7 und 100 %, während die Spezifität bei pathologischen Kontrollseren zwischen 90,9 und 100 % liegt[6]. Neuere Daten bestätigen, dass trotz der hervorragenden diagnostischen Leistungen dieser Methoden bei etwa 5 % der Patienten mit Erkrankung durch GBM-Antikörper / Goodpasture-Syndrom keine zirkulierenden Antikörper nachweisbar sind[7].

Aufgrund ihrer hohen klinischen Bedeutung und des hohen Vorhersagewertes ist die Bestimmung von GBM-AK bei der Diagnose von Patienten mit einem klinischen Bild mit Niereninsuffizienz unbekannter Ursache mit Mikrohämaturie angezeigt, insbesondere bei rasch fortschreitenden Fällen.

Der Titer der zirkulierenden GBM-Antikörper ist von Nutzen für die Prognose[8].

Bei Vorliegen eines die Nieren und Lungen betreffenden Syndroms können GBM-Antikörper bei etwa einem Drittel der Patienten nachgewiesen werden.

GBM-Antikörper sind direkt für die Organschäden verantwortlich; ihre Überwachung gilt daher als äußerst hilfreich für die Kontrolle der Behandlung, insbesondere bei Behandlung mit Plasmapherese. Andauernde negative GBM-AK-Ergebnisse sind eine unerlässliche Voraussetzung für Patienten, die auf eine Transplantation warten, um die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Krankheit im verpflanzten Organ auf ein Minimum zu reduzieren.

Da auch ANCA-assoziierte systemische Vaskulitiden mit einem klinischen Bild von rasch progressiver GN auftreten können, ist gleichzeitig mit der Bestimmung von GBM-AK auch die Bestimmung von ANCA hilfreich. Es sollte berücksichtigt werden, dass bei einem bedeutenden Anteil von Patienten mit GBM-AK (10-38 %) gleichzeitig ANCA vorliegen, im allgemeinen mit Spezifität für Myeloperoxidase (ANCA-MPO), deren klinische Bedeutung nicht klar ist[6,9,10].

Bezüglich des diagnostischen Nutzens der Labordaten ist zu berücksichtigen, dass die positiven und negativen Vorhersagewerte (PVW, NVW) außer von der Sensitivität und Spezifität des Tests auch von der Häufigkeit der Krankheit in der untersuchten Bevölkerung abhängen. Eine angemessene Anforderung (erhöhte Wahrscheinlichkeit vor dem Test) ermöglicht es, ein Ergebnis mit tatsächlicher klinischer Bedeutung zu erhalten, und verringert deutlich die Möglichkeit von falschen positiven Ergebnissen.

PRINZIP DER METHODE

Der Kit *ZENIT GBM* für die quantitative Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran verwendet eine indirekte immunologische Methode in zwei Schritten auf der Grundlage des Chemilumineszenzprinzips.

Das stark gereinigte NC1α3(IV)-Antigen wird zur Beschichtung der Magnetpartikel verwendet (Festphase), und ein Antikörper gegen humane IgG wird mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat).

Während der ersten Inkubation binden sich die spezifischen Antikörper in der Probe, in den Kalibratoren oder in den Kontrollseren an die Festphase.

Während der zweiten Inkubation reagiert das Konjugat mit den an die Festphase gebundenen GBM-Antikörpern.
Nach jeder Inkubation wird das nicht an die Festphase gebundene Material durch Absaugen und anschließendes Waschen entfernt.
Die Menge des markierten Konjugats, das an die Festphase gebunden wurde, wird mittels Aktivierung der Chemilumineszenzreaktion und Messung des Lichtsignals bewertet. Das erzeugte Signal wird in relativen Lichteinheiten (RLU - Relative Light Units) ausgedrückt und zeigt die Konzentration der in der Probe, in den Kalibratoren und in den Kontrollseren vorliegenden spezifischen Antikörper an.

AUTOMATISIERUNG

Das Analysegerät *ZENIT RA* führt automatisch alle Schritte durch, die im Protokoll für den Test vorgesehen sind: Hinzufügen von Proben, Kalibratoren, Kontrollseren, Magnetpartikeln, Konjugat und Aktivierungslösungen für die Chemilumineszenz in den Reaktionsbehälter; magnetische Trennung und Waschen der Partikel; Messen des emittierten Lichts.
Das System berechnet die Testergebnisse der Proben und Kontrollseren mittels der gespeicherten Kalibrierungskurve und druckt einen Bericht aus, der alle Informationen bezüglich des Tests und des Patienten enthält.

MATERIALIEN UND REAGENZIEN

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

REAG	1	MP	2.5 mL

Magnetpartikel, beschichtet mit stark gereinigtem NC1α3(IV)-Antigen, in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen, einem Tensid, Pro-Clin 300 und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	2	CONJ	15 mL

Monoklonale Mausantikörper gegen humane IgG, mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat), in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	3	DIL	25 mL

Probenverdünnungsmittel: Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem blauen Farbstoff und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	4	CAL A	1.6 mL

Humanserum mit niedriger Konzentration von GBM-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO_4 als Konservierungsmittel.

REAG	5	CAL B	1.6 mL

Humanserum mit hoher Konzentration von GBM-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO_4 als Konservierungsmittel.

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.
Die Reagenzien 1, 2 und 3 sind in einem gemeinsamen Behälter, der Reagenzienkartusche, zusammengestellt.
Die Konzentrationen der Kalibratoren sind in AU/ml (Arbitrary Units - willkürliche Einheiten) angegeben und gegen einen internen Referenzstandard kalibriert. Die für jede Produktcharge spezifischen Konzentrationswerte sind in der im Kit enthaltenen DATA DISK verzeichnet.

DATA DISK

Mini-DVD mit Informationen zu allen Produkte der Reihe ZENIT RA (Reagenzien, Kalibratoren, Kontrollseren), aktualisiert bis zur letzten Produktionscharge, unter Ausschluss der Produkte, die zum Zeitpunkt der Zusammenstellung der neuen DATA DISK abgelaufen sind.
Es reicht aus, die DATA DISK mit der höchsten Chargennummer aufzubewahren, um die für den korrekten Betrieb des Systems notwendigen Informationen auf dem jeweils aktuellsten Stand zu halten.

Benötigte, im Kit nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien

- ZENIT RA Analysegerät Best.-Nr. 41400

- ZENIT RA Cuvette Cube * Best.-Nr. 41402
  Packung mit 960 Küvetten

- ZENIT RA System Liquid * Best.-Nr. 41409
  1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 10x (Systemflüssigkeit).

- ZENIT RA Wash Solution * Best.-Nr. 41407
  1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 20x (Waschlösung).

- ZENIT RA Trigger Set * Best.-Nr. 41403
  1 Flasche mit 250 ml Trigger A (Voraktivierungslösung)

1 Flasche mit 250 ml Trigger B (Aktivierungslösung)

- ZENIT RA D-SORB Solution Best.-Nr. 41436
  Packung mit 2 Flaschen mit je 1 Liter gebrauchsfertiger Lösung.

- ZENIT RA Cartridge Checking System * Best.-Nr. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Best.-Nr. 41566
  300 rote Verschlusskappen zum Verschließen der Kalibratorenbehälter nach der ersten Anwendung.

(*) Das Analysegerät ZENIT RA und die mit einem Sternchen identifizierten Zubehörteile werden von Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgien, hergestellt und von A. Menarini Diagnostics Srl vertrieben.

Weitere empfohlene Reagenzien

ZENIT RA ANCA/GBM Control Set Best.-Nr. 41449
3 Fläschchen mit je 1,5 ml GBM-AK-negativem Humanserum und 3 Fläschchen mit je 1,5 ml GBM-AK-positivem Humanserum.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die mit dem Kit *ZENIT RA GBM* gelieferten Reagenzien dienen ausschließlich der In-vitro-Diagnostik und dürfen nicht in vivo bei Menschen oder Tieren verwendet werden.
Dieses Produkt ist von professionellen Anwendern unter strikter Beachtung der in diesem Dokument vorliegenden Anweisungen zu verwenden.

Menarini kann nicht für Verluste oder Schäden verantwortlich gemacht werden, die aus einer nicht den mitgelieferten Anweisungen entsprechenden Anwendung entstehen.

Sicherheitsmaßnahmen
Dieses Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und ist daher wie Infektionserreger enthaltendes Material zu behandeln.
Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlicher Herkunft. Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Kit verwendeten Serum- oder Plasmaeinheiten wurden mit von der FDA genehmigten Methoden auf das Vorliegen von HBsAg, HCV-Antikörpern, HIV1-Antikörpern und HIV2-Antikörpern untersucht und für nicht reaktiv befunden.
Da jedoch keine Untersuchungsmethode die Abwesenheit von Krankheitserregern garantieren kann, sind alle Materialien menschlicher Herkunft als potentiell infiziert anzusehen und entsprechend zu handhaben.
Falls die Verpackung beschädigt wird und Reagenzien austreten, schützen Sie sich mit einer geeigneten persönlichen Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) und dekontaminieren Sie den betroffenen Bereich mit einer verdünnten Natriumhypochloritlösung.

Entsorgen Sie das für die Reinigung verwendete Material und die von dem Materialaustritt betroffenen Verpackungen gemäß den nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell infizierter Abfälle.
Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid mit Blei, Kupfer oder verbleitem Messing reagieren und so in den Abflussrohren explosive Azide bilden kann, wird empfohlen, die Reagenzien oder Abfälle nicht in den Abfluss zu entsorgen, sondern die nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell gefährlicher Abfälle zu befolgen.

Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung
Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten ist es notwendig, dass Sie sich strikt an diese Gebrauchsanleitung halten und die Angaben in der Bedienungsanleitung des Analysegerätes genau befolgen.
Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind nur mit dem Analysegerät *ZENIT RA* zu verwenden.
Die Bestandteile der Reagenzienkartusche können nicht aus der Kartusche entfernt und neu zusammengestellt werden.
Den Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufbewahren.
Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzienkartusche und die Kalibratoren vor dem Öffnen bis zum Verfallsdatum haltbar.
Nach dem Öffnen kann die Reagenzienkartusche 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C oder im Gerät aufbewahrt wird.
Nach dem Öffnen können die Kalibratoren 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden und pro Lauf nicht länger als 6 Stunden im Gerät verbleiben.
Reagenzien und Kalibratoren nicht einfrieren.

ZUBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Die Bestimmung ist mit humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA - Natriumcitrat) durchzuführen.
Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer und trüber Proben wird abgeraten.
Wenn die Bestimmung mehr als 8 Stunden nach der Entnahme erfolgt, trennen Sie das Serum von dem Blutklumpen oder das Plasma von den roten Blutkörperchen und füllen Sie die Probe aus den primären Geltrennröhrchen in sekundäre Reagenzröhrchen ohne Zusätze um.
Vor der Untersuchung können die Proben höchstens 7 Tage lang im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
Wenn die Bestimmung nach mehr als 7 Tagen durchgeführt wird, sind die Proben einzufrieren (< -20 °C).
Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

VERFAHREN

Halten Sie sich genauestens an die Anweisungen in der Bedienungsanleitung des Gerätes, um eine zuverlässige Analyseleistung zu erhalten.

Einsetzen der Reagenzien

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Vor dem Einsetzen der Kartusche in das System muss der Behälter mit den Magnetpartikeln durch horizontales Drehen geschüttelt werden, um die Resuspendierung der Partikel zu erleichtern. Dabei ist die Bildung von Schaum zu vermeiden.

Setzen Sie die Reagenzienkartusche mit Hilfe der entsprechenden Führung in den Reagenzienbereich des Gerätes ein und lassen Sie sie vor der Anwendung mindestens 60 Minuten lang schütteln.

Bei Einsetzen der Reagenzienkartusche wird gleichzeitig deren identifizierender Barcode abgelesen. Falls das Etikett der Kartusche beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Reagenzienkartusche von Hand eingegeben werden.

Das Gerät sorgt automatisch für das kontinuierliche Schütteln der Magnetpartikel.

Wenn die Reagenzienkartusche aus dem Gerät entfernt wird, ist sie bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufzubewahren.

Einsetzen der Kalibratoren

Die Kalibratoren des Systems ZENIT RA sind gebrauchsfertig. Lassen Sie die Kalibratoren 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und schütteln Sie vorsichtig den Inhalt, von Hand oder mit dem Vortex-Mixer, ohne dass sich dabei Schaum bildet.

Falls die Kalibratoren zum ersten Mal verwendet werden, eliminieren Sie vor dem Einsetzen in das Gerät das Garantiesiegel und die weiße Verschlusskappe.

Falls die Kalibratoren bereits verwendet wurden, ist der Behälter mit einer oberen Kappe (rote Kappe) versehen und hat kein Garantiesiegel. Entfernen Sie die rote Verschlusskappe vor dem Einsetzen der Kalibratoren in das Gerät.

Setzen Sie die Kalibratoren in den Probenbereich des Gerätes ein; Informationen zu ihrer Identifizierung im Gerät finden Sie in der Bedienungsanleitung des Gerätes. Falls das Etikett beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, müssen die Daten des Barcodes von Hand eingegeben werden.

Die Konzentrationswerte der in den Kalibratoren vorliegenden IgG-Antikörper gegen GBM sind auf der DATA DISK verzeichnet und werden automatisch an das Analysegerät übertragen.

Am Ende des Laufs sind die Behälter der Kalibratoren mit den dafür bestimmten oberen Kappen (rote Kappen) zu verschließen und bis zu ihrer nächsten Anwendung bei 2-8 °C aufzubewahren.

Die Kalibratoren können höchstens viermal verwendet werden.

Einsetzen der Kontrollseren

Setzen Sie die Kontrollseren in den Probenbereich des Gerätes ein. Informationen zu ihrer Identifizierung im Gerät finden Sie in der Bedienungsanleitung des Gerätes. Falls das Kontrollserum nicht mit einem Barcode

versehen ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten des Kontrollserums von Hand eingegeben werden. Wenn Sie Kontrollseren der Reihe Zenit RA verwenden, lesen Sie deren Gebrauchsanleitung. Die Konzentrationswerte der in den Kontrollseren der Reihe Zenit RA vorliegenden IgG-Antikörper gegen GBM sind auf der DATA DISK verzeichnet und werden automatisch an das Analysegerät übertragen. Wählen Sie für jedes Kontrollserum die angeforderten Parameter aus.

Einsetzen der Proben

Setzen Sie die Proben in den Probenbereich des Gerätes ein; Informationen zu ihrer Identifizierung im Gerät finden Sie in der Bedienungsanleitung des Gerätes. Falls die Probe nicht mit einem Barcode versehen ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Probe von Hand eingegeben werden.

Wählen Sie für jede Probe die angeforderten Parameter aus.

Kalibrierung

Das Analysegerät *ZENIT RA* verwendet eine gespeicherte Kalibrierungskurve (Masterkurve), die vom Hersteller für jede Charge der Reagenzienkartuschen erzeugt wird.

Die Parameter der Masterkurve sind zusammen mit den Konzentrationswerten der Kalibratoren auf der DATA DISK gespeichert und werden in die Datenbank des Gerätes übertragen.

Die Kalibratoren A und B werden verwendet, um entsprechend dem verwendeten Gerät und den Reagenzien im Gerät die Masterkurve nachzukalibrieren.

Analysieren Sie zum Nachkalibrieren die beiden Kalibratoren A und B dreifach und die Kontrollseren einfach. Die mit den Kontrollseren erhaltenen Konzentrationswerte ermöglichen es, die neue Kalibrierung zu validieren. Nachdem die Nachkalibrierung der Masterkurve akzeptiert und gespeichert wurde, können alle nachfolgenden Proben ohne weitere Kalibrierung analysiert werden, es sei den, es tritt einer der folgenden Fälle ein:

- eine Reagenzienkartusche einer neuen Charge wird in das Gerät eingesetzt;
- die Werte der Kontrollseren liegen nicht innerhalb des Akzeptanzbereiches;
- es wurden Wartungsverfahren am Gerät durchgeführt;
- die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve ist abgelaufen.

Die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve für den Kit *ZENIT RA GBM* beträgt 21 Tage.

Die Nachkalibrierung wird vom Gerät automatisch verwaltet.

Bestimmung

Drücken Sie die Starttaste.

1. Das System saugt 80 µl Probenverdünnungsmittel, 40 µl Magnetpartikel, 100 µl Probenverdünnungsmittel und 10 µl Probe oder Kontrollserum an (für die Kalibratoren wird das positive Serum mit dem Probenverdünnungsmittel vorverdünnt geliefert, und das entnommene Volumen beträgt 110 µl). Die angesaugten Lösungen und Suspensionen werden in die Reaktionsküvette gegeben.
2. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
3. Nach dieser Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen.
4. In die Küvette werden 200 µl Konjugat gegeben.
5. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.

6. Nach dieser letzten Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen, und die Küvette wird in die Messkammer überführt.
7. Die in RLU angegebene Menge des an die Festphase gebundenen Konjugats ist direkt proportional zu der Konzentration der in der Probe vorliegenden GBM-IgG-Antikörper.
8. Die erhaltenen Ergebnisse werden auf die Kalibrierungskurve aufgetragen und in Konzentrationen umgerechnet.

Proben mit Konzentrationswerten über dem oberen Messgrenzwert können verdünnt und erneut getestet werden. Der neue Wert wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert, um das Endergebnis zu erhalten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Gültigkeit der Bestimmung zu garantieren, müssen an jedem Tag, an dem dieser Test durchgeführt wird, Kontrollseren mit unterschiedlichen Konzentrationen (mindestens ein negatives und ein positives Serum) gemessen werden.
Falls Ihr Labor für die Überprüfung der Ergebnisse der Bestimmung die häufigere Anwendung oder die Anwendung einer höheren Anzahl von Kontrollseren erfordert, befolgen Sie die im Labor festgelegten Qualitätskontrollverfahren.
Wenn Kontrollseren der Reihe ZENIT RA verwendet werden, sind die erwarteten Mittelwerte und die Akzeptanzgrenzen in der auch mit den Kontrollseren gelieferten DATA DISK angegeben.
Falls andere Kontrollseren angewendet werden, sind vor deren Anwendung die mit den Reagenzien und dem System ZENIT RA erwarteten Werte zu bestimmen.
Wenn die Werte der Kontrollseren nicht in den angegebenen Akzeptanzbereich fallen, sind die zugehörigen Testergebnisse nicht gültig, und die entsprechenden Proben müssen erneut getestet werden.
In diesen Fällen ist es vor der Wiederholung der Bestimmung nötig, das Verfahren zur Nachkalibrierung durchzuführen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Das System berechnet automatisch die Konzentration der in den untersuchten Proben vorliegenden GBM-IgG-Antikörper. Die Werte können auf dem Bildschirm eingesehen oder ausgedruckt werden.
Die Konzentrationen werden in AU/ml angegeben.
Die Konzentration des Analyten in der Probe wird berechnet, indem das erhaltene Ergebnis jeder Probe auf einer Kalibrierungskurve abgelesen wird; letztere wird mittels einer 4-Parameter-Logistic-Fit-Funktion erstellt (4PL, Y erwogen) und regelmäßig entsprechend den mit der Bestimmung der Kalibratoren erhaltenen Ergebnissen korrigiert.

Detaillierte Informationen zur Berechnung der Ergebnisse durch das System finden Sie in dessen Bedienungsanleitung.

Interpretation der Ergebnisse

Der Messbereich für die quantitative Bestimmung mit *ZENIT RA GBM* ist: 0,0 - 1000 AU/ml.

Werte unter 0,0 AU/mL sind extrapolierte Werte; es erscheint die Meldung „OMR-“ und/oder „ORA“, und die Werte werden als „gleich 0,0 AU/mL“ angegeben.

Bei Werten über 1000 AU/mL erscheint die Meldung „OMR+“ und/oder „ORA“, und die Proben können nach geeigneter Verdünnung erneut getestet werden.

Die Ergebnisse der Proben können wie folgt interpretiert werden:

(AU/ml)	Interpretation
< 40	Die Probe ist als negativ für das Vorliegen von GBM-IgG-Antikörpern anzusehen.
≥ 40	Die Probe ist als positiv für das Vorliegen von GBM-IgG-Antikörpern anzusehen.

Die obengenannten Werte sind nur vorgeschlagene Werte. Jedes Labor muss seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

Für Diagnosezwecke sind die mit dem Kit *ZENIT RA GBM* und dem Analysesystem *ZENIT RA* erhaltenen Ergebnisse zusammen mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden klinischen und Labordaten zu verwenden.

Eine bakterielle Verunreinigung der Proben und Wärmeinaktivierung können das Ergebnis der Bestimmung beeinträchtigen.

Heterophile Antikörper in Humanserumproben können mit Reagenzien auf Immunglobulinbasis reagieren und so immunologische In-vitro-Bestimmungen beeinträchtigen. Solche Proben können bei Analyse mit dem Kit *ZENIT RA GBM* zu abnormalen Werten führen.

Proben von Patienten mit chronischen Leberkrankheiten, chronischen Infektionen, Kollagenosen und Myelomen mit Hypergammaglobulinämie (IgG-Konzentration über 1800 mg/dl) können in einigen Fällen positive Werte für IgG-Antikörper gegen GBM zeigen.

ERWARTETE WERTE

Es wurden Proben von 100 gesunden Patienten untersucht, um das Vorliegen von IgG-Antikörpern gegen GBM zu überprüfen.

Alle untersuchten Proben waren negativ, mit einem Mittelwert von 1,1 AU/ml und einer Standardabweichung von 3,2 AU/ml.
Mit diesen Ergebnissen wurde die Leerwertgrenze berechnet („Limit of Blank“, LoB = der höchste Wert, der in einer Reihe von Proben ohne den Analyten erwartet werden kann). Die Leerwertgrenze wurde als das 95. Perzentil der negativen Bevölkerung bestimmt und liegt bei 6,3 AU/ml mit der Reagenziencharge 2.

KLINISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Mit dem Kit *ZENIT RA GBM* wurden insgesamt 156 Proben untersucht, darunter 30 Proben von Patienten mit Goodpasture-Syndrom (GPS), 2 Proben von Patienten mit rasch progressiver Glomerulonephritis (RPGN), 95 Proben von Patienten mit anderen Krankheiten (18 systemische Kollagenosen, 12 ANCA-assoziierte Vaskulitiden, 15 Fälle von rheumatoider Arthritis, 4 Fälle von Zöliakie, 38 Infektionskrankheiten, 8 sonstige Krankheiten), 29 Proben von normalen Versuchspersonen.

In der mutmaßlich negativen untersuchten Bevölkerung (18 systemische Kollagenosen, 12 ANCA-assoziierte Vaskulitiden, 15 Fälle von rheumatoider Arthritis, 4 Fälle von Zöliakie, 38 Infektionskrankheiten, 8 sonstige Krankheiten und 29 Proben von normalen Versuchspersonen) wurden für keine Probe positive Ergebnisse erhalten.

- **Diagnostische Spezifität**: 100 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 96,3-99,9 %); von 124 Proben erbrachten 124 ein negatives Ergebnis.

In der mutmaßlich positiven untersuchten Bevölkerung (30 Proben von Patienten mit Goodpasture-Syndrom (GPS) und 2 Proben von Patienten mit rasch progressiver Glomerulonephritis (RPGN)) wurde für alle Proben ein positives Ergebnis erhalten.

- **Diagnostische Sensitivität**: 100 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 86,7-99,7 %); (32/32 Proben).

Entsprechend den Ergebnissen der diagnostischen Spezifität und Sensitivität liegt die diagnostische Übereinstimmung bei 100 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 96,7-99,9 %); (156/156 Proben).

LEISTUNGEN

Warnung: Die angegebenen Daten stellen nicht die Funktionsspezifikationen des Kits dar, sondern sind der experimentelle Nachweis dafür, wie der Kit auf die vom Hersteller vorgesehene Art innerhalb dieser Spezifikationen funktioniert.

Präzision und Wiederholbarkeit

Die ***Präzision*** wurde berechnet, indem die Ergebnisse von 20 Wiederholungen von vier Seren (einem negativen und drei positiven mit verschiedenen Konzentrationen von GBM-IgG-AK), die mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen während desselben analytischen Laufs untersucht wurden, analysiert wurden.
Die Konzentration des für GBM-IgG-AK negativen Serums (N4) lag im Bereich von 0,0 bis 0,4 AU/mL mit der Reagenziencharge 2 und bei 0,0 AU/mL mit der Reagenziencharge 3.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3 positiven Seren.

Probe	Reagenziencharge Nr.	Mittlere Konzentration (AU/mL)	SD (AU/mL)	VK %
P1	2	81,4	2,52	3,1
	3	64,7	2,07	3,2
P2	2	243,5	18,82	7,7
	3	270,9	11,88	4,4
P3	2	471,5	13,57	2,9
	3	371,9	12,06	3,2

Die ***Wiederholbarkeit*** wurde berechnet, indem die Ergebnisse der einfachen Bestimmung von sechs Seren (einem negativen und fünf positiven mit verschiedenen Konzentrationen von GBM-IgG-AK), durchgeführt in 14 verschiedenen Läufen mit einer Reagenziencharge, analysiert wurden.
Die Konzentration des für GBM-IgG-AK negativen Serums (EBV-N1) lag im Bereich von 0,5 bis 2,2 AU/mL.
Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der fünf positiven Seren.

Probe	Mittlere Konzentration (AU/mL)	SD (AU/mL)	VK %
GBM-P1	51,2	4,62	9,0
GBM-P2	205,0	15,06	7,3
GBM-P3	296,3	28,84	9,7
GBM-P4	91,6	7,16	7,8
GBM-P5	222,8	18,68	8,4

Linearität der Verdünnungen

Zur Beurteilung der Linearität der Verdünnungen mit dem Kit *ZENIT RA GBM* wurden abgestufte Verdünnungen von 3 Seren mit hohen Konzentrationen von GBM-IgG-AK untersucht; zur Verdünnung wurde die Systemflüssigkeit verwendet.
Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gemessene Konzentration (AU/ml)	Erwartete Konzentration (AU/ml)	Wiederfindung %
1	1	338,0	--	(100)
	2	169,0	169,0	100,0
	4	83,2	84,5	98,5
	8	42,1	42,3	99,5
2	1	353,3	-	(100)
	2	173,0	176,7	97,9

	4	93,0	88,3	105,3
	8	42,7	44,2	96,6
3	1	223,6	-	(100)
	2	124,0	111,8	110,9
	4	67,4	55,9	121,0
	8	33,9	28,0	121,1

Es ist darauf hinzuweisen, dass möglicherweise einige Seren bei Messung verschiedener Verdünnungen innerhalb des Messbereiches nicht-lineare Ergebnisse erbringen, da das Ergebnis nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Affinität der in der Probe vorliegenden Antikörper abhängt.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Kits *ZENIT RA GBM*, die als ***Nachweisgrenze*** *(Limit of Detection - LoD*, d.h. die geringste Menge des Analyten, die mit der Methode gemessen werden kann) angegeben wird, wurde mit der Gleichung LoD = LoB + C_β SD_s bewertet (wobei LoB die Leerwertgrenze und SD_s die geschätzte Standardabweichung der Verteilung der Probe mit niedriger Konzentration ist und C_β vom 95. Perzentil der Standard-Gaußverteilung abgeleitet wird).

Es wurden 5 Proben mit niedriger Konzentration des Analyten verwendet, die in 14 verschiedenen Versuchen mit einer Reagenziencharge einfach bestimmt wurden.

Als Nachweisgrenze des Kits *ZENIT RA GBM* wurde 13,5 AU/ml bestimmt.

Zusammen mit klinischen Überlegungen und den Ergebnissen von Vergleichen mit Referenzmethoden hat der Wert der Nachweisgrenze zur Definition des Cut-Off-Wertes beigetragen.

Analytische Spezifität: Interferenzen

Die Leistungen des Tests werden durch das Vorliegen der in der nachfolgenden Tabelle angeführten potentiell interferierenden Substanzen in der Probe bis zu der untersuchten Konzentration nicht beeinflusst.

Potentiell interferierende Substanzen	Höchste untersuchte Konzentration
Freies Bilirubin	20 mg/dL
Konjugiertes Bilirubin	20 mg/dL
Hämoglobin	1000 mg/dL
Triglyceride	3000 mg/dL

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer oder trüber Proben wird jedoch abgeraten.

Analytische Spezifität: Kreuzreaktionen

Um eventuelle Kreuzreaktionen des für die Sensibilisierung der Mikropartikel verwendeten Antigens zu beurteilen, wurde eine Untersuchung mit 49 Proben durchgeführt, die alle hohe Konzentrationen anderer Autoantikörper aufwiesen und negativ für GBM-IgG-AK waren.
Die verwendeten Proben setzten sich wie folgt zusammen: CCP und/oder FR (15), Gliadin A und/oder G und/oder tTG-A (4), ANCA-positiv (12) und ANA und/oder ENA (18).
Die Untersuchung hat keine bedeutsamen Kreuzreaktionen des Antigens in der Festphase mit den anderen Autoantikörpern gezeigt.

Sättigungseffekt bei hohen Konzentrationen

Einige immunologische Methoden können unterschätze Werte für den Analyten anzeigen (Hook-Effekt), wenn sie zur Bestimmung von Proben mit extrem hohen Analytenkonzentrationen verwendet werden.
Da die von dem Kit *ZENIT RA GBM* verwendete Methode eine Methode mit zwei Inkubationen ist, ist sie von diesem Effekt nicht betroffen.
Eine Probe mit einer extrem hohen Konzentration (oberhalb des Messbereiches) von IgG-Antikörpern gegen GBM hat bestätigt, dass bis zu einer Konzentration von 1552 AU/ml kein Hook-Effekt eintritt.

Relative Sensitivität und Spezifität

Das Vorliegen von IgG-Antikörpern gegen GBM wurde in 156 Proben mit dem Kit ZENIT RA GBM und mit einer im Handel erhältlichen ELISA-Methode bestimmt: 30 Proben von Patienten mit Goodpasture-Syndrom (GPS), 2 Proben von Patienten mit rasch progressiver Glomerulonephritis (RPGN), 95 Proben von Patienten mit anderen Krankheiten (18 systemische Kollagenosen, 12 ANCA-assoziierte Vaskulitiden, 15 Fälle von rheumatoider Arthritis, 4 Fälle von Zöliakie, 38 Infektionskrankheiten, 8 sonstige Krankheiten), 29 Proben von normalen Versuchspersonen.
Bei 5 Proben stimmten die Ergebnisse des ZENIT-RA-Tests und des im Handel erhältlichen ELISA-Tests nicht überein.
Die ***relative Übereinstimmung*** ist daher 96,8 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 92,3-98,8 %); (151/156 Proben).
Die ***relative Sensitivität*** ist 90,9 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 74,5-97,6 %); (30/33 Proben).
Die ***relative Spezifität*** ist 98,4 % (Konfidenzintervall bei 95 %: 93,7-98,7 %); (121/123 Proben).
Von den drei Proben, die mit dem Kit ZENIT RA GBM negativ und mit dem ELISA-Kit positiv waren, gehörte 1 zur Gruppe der Proben mit Infektionskrankheiten, 1 zur Gruppe mit weiteren Krankheiten und 1 zur Gruppe der Proben von normalen Versuchspersonen.
Die zwei Proben, die mit dem Kit ZENIT RA GBM positiv und mit dem ELISA-Kit negativ waren, gehörten beide zur Gruppe der Proben mit Goodpasture-Syndrom.

LITERATUR

1. Salama AD, Levy JB, Lightstone, Pusey CD. Goodpasture's disease. Lancet 2001; 358: 917-20.

2. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ, The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 1967; 126: 989-1004.

3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med 2003; 348: 2543-56.

4. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma-exchange and immunosuppression. Ann Int Med 2001; 134: 1033-42.

5. Wilson CB, Dixon FJ. Diagnosis of immunopathologic renal disease. Kidney Int 1974; 5: 389-401.

6. Sinico RA, Radice A, Corace C, Sabadini E. Anti-glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis of Goodpasture syndrome: a comparison of different assays. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 397-401.

7. Mahler M, Radice A, Sinico RA, Damoiseaux J, Seaman A, Buckmelter K et al. Performance evaluation of a novel chemiluminescence assay for detection of anti-GBM antibodies: an International multicenter study. Nephrol Dial Transplant 2012; 27 (1): 243-52.

8. Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement membrane antibodies. Nephron Clin Pract 2003; 94: 59-68.

9. Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 376-85.

10. Levy JB, Hammad T, Coulthart A, Dougan T, Pusey CD. Clinical feature and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. Kidney Int 2004; 66: 1535-40.

TECHNOGENETICS S.r.l.
Via della Filanda, 26
26900 – Lodi - Italien

AUSTRIA

Vertrieb durch

A. Menarini G.m.b.H
Pottendorfer Strasse, 25-27 - A - 1120 Wien
Tel. +43 1 80 41 5760 - Fax +43 1 80 43 194
www.menarinidiagnostics.at

GERMANY

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics Deutschland
Eine Division der Berlin-Chemie AG
Glienicker Weg 125 - 12489 Berlin
Tel. +49 30 67 07 30 00 - Fax +49 30 67 07 30 20
www.menarinidiagnostics.de